

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 9 月 7 日 (07.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/64241 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/32, 38/22, 9/19, 9/08, 47/18, 47/10, 47/34
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01524
- (22) 国際出願日: 2001 年 2 月 28 日 (28.02.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-53310 2000 年 2 月 29 日 (29.02.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 泰 (SATO, Yasushi) [JP/JP]. 齋藤彰彦 (SAITO, Akihiko) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 山崎忠男 (YAMAZAKI, Tadao) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREPARATIONS STABILIZED OVER LONG TIME

WO 01/64241 A1

(54) 発明の名称: 長期安定化製剤

(57) Abstract: Stable protein preparations which contain tryptophan, tryptophan derivatives or salts thereof as a stabilizing agent.

(57) 要約:

安定化剤としてトリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩を含む安定したタンパク質製剤。

明細書
長期安定化製剤

技術分野

- 5 本発明はタンパク質製剤に関し、特に長期保存した後も活性成分の損失が少ない、トリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩を含有した、安定化したタンパク質製剤に関する。

背景技術

- 10 遺伝子組換え技術の発達によって、種々のタンパク質製剤が安定した供給量で提供されるようになった。これらの製剤は安定性を確保するため、凍結乾燥したタンパク質成分粉末とこれを溶解するための水溶性希釈液とを別途包装し、使用時に溶解する形態で提供されるか、あるいは安定性を向上させるための添加剤を加えたタンパク質溶液製剤の形で提供されている。
- 15 例えば、好中球の前駆細胞に作用し、その増殖ならびに分化成熟を促進する分子量約2万の糖タンパク質である顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）が遺伝子工学的方法によって微生物や動物細胞を用いて組換えヒトG-CSFとして大量に生産することが可能になった。本願出願人はこの精製したG-CSFの製剤化に成功し、これを感染防御剤として市場に製品を供給している（特許第211
- 20 6515号）。

- G-CSFは極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、0.1～1000 μ g（好ましくは5～500 μ g）のG-CSFを含有する製剤を1～7回/週の割合で投与する。しかしながら、このG-CSFは例えば注射用アンプル、注射器等の器壁に対し吸着性を示す。また、G-CSFは不安定で、外的因子の影響を受けやすく、温度、湿度、酸素、紫外線等に起因して会合、重合あるいは酸化等の物理的、化学的变化を生じ、結果として大きな活性の低下を招く。
- 25 ところで安定なG-CSF製剤を市場に供給するために種々の処方設計がなされている。例えば、（a）トレオニン、トリプトファン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン、システイン、シスチン、メチオニンから選ばれる

少なくとも1種のアミノ酸；(b) 少なくとも1種の含硫還元剤；又は(c) 少なくとも1種の酸化防止剤；からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む製剤（特許第2577744号）等が提案されている。また、安定化剤としてポリソ
5 26号）。

さらに、容器への付着を少なくし、化学的変化を押さえるという観点からは、凍結乾燥製剤とすることが有利であり、マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含有したG-C-S-F凍結乾燥製剤も報告されている（特表平8-504784号）。

10 現在市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的変化を抑制するために安定化剤としてヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質が使用されているものがある。しかしながら、タンパク質を安定化剤として添加することに関しては、ウィルスのコンタミネーションを除去する等のために非常に煩雑な工程を必要とする等の問題があった。

15 しかしながら、このようなタンパク質を添加しない場合には、G-C-S-Fの会合体の生成が多くなり、品質劣化をもたらすという問題があった。

また、赤血球系前駆細胞の分化、増殖を促進する酸性糖タンパク質ホルモンであるエリスロポエチン（EPO）も、遺伝子工学的方法によって組換えヒトEPOとして大量に生産され、本願出願人はこの精製したEPOの製剤化（凍結乾燥
20 製剤）に成功し、腎性貧血改善剤などとして市場に製品を供給している。

安定なEPO製剤を市場に供給するための処方設計では、EPOに見られる化学的変化（加水分解、ジスルフィド交換反応など）あるいは物理的変化（変性、凝集、吸着など）を抑制する必要がある。現在市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的変化を抑制するために、安定化剤として一般的に使用され
25 ているヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質が添加されているものがある。しかし、タンパク質の添加については上述した問題がある。

安定なEPO溶液製剤を市場に供給するための処方設計では、ロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジンおよびリジンならびにその塩から選択されるアミノ酸を安定化剤として含むEPO溶液製剤が提案

されている（特願平１１－５２３１４号）。

タンパク質へのアセチルトリプトファンの添加としては、アルブミン、ヒト成長ホルモン、ヒトＢ細胞分化因子（human B cell differentiation factor：BCDF）等で行われている（特公平７－６８１３７号、特開平１０－２６５４０４号、特
5 開平３－２７３２０号）。しかしながら現在までのところ、Ｇ－ＣＳＦやＥＰＯのような造血因子に対してアセチルトリプトファンを添加して安定化させることは知られていない。

本発明の目的は、安定化剤としてタンパク質を含有せず、しかも長期の保存にも安定なタンパク質製剤を提供することである。

10

発明の開示

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤としてトリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩を添加することによって、長期保存後でもタンパク質残存率が高いタンパク質製剤となしうることを見いだ
15 し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、安定化剤としてトリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩を含む安定したタンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、安定化剤がアセチルトリプトファン又はアセチルトリプトファン誘導体、又はその塩である前記タンパク質製剤を提供する。

20 本発明はさらに、安定化剤がアセチルトリプトファン又はその塩である前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、タンパク質が糖鎖を有することを特徴とする前記タンパク質製剤を提供する。

25 本発明はさらに、タンパク質が遺伝子組換え法により産生されたことを特徴とする前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、タンパク質がＣＨＯ細胞で産生されたことを特徴とする前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、タンパク質が造血因子であることを特徴とする前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、タンパク質がエリスロポエチンであることを特徴とする前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、タンパク質がG-CSFであることを特徴とする前記タンパク質製剤を提供する。

- 5 本発明はさらに、安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、凍結乾燥製剤である前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、溶液製剤である前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、マンニトールをさらに含む前記タンパク質製剤を提供する。

- 10 本発明はさらに、界面活性剤をさらに含む前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリソルベート20及び／又は80である前記タンパク質製剤を提供する。

- 15 本発明はさらに、pHが4～8である前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが6.0～7.5である前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、メチオニンを含み前記タンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、トリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩の添加量が1～100mMである前記タンパク質製剤を提供する。

- 20 本発明はさらに、50℃～1ヶ月間の加速試験後におけるタンパク質残存率が90%以上であるか、60℃～2週間の加速試験後におけるタンパク質残存率が90%以上である、前記G-CSFタンパク質製剤を提供する。

本発明はさらに、50℃～1週間の加速試験後又は60℃～1週間の加速試験後におけるタンパク質残存率が85%以上である、前記EPOタンパク質製剤を

- 25 提供する。

発明を実施するための最良の形態

本発明の製剤に使用するタンパク質は、例えば、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロ

ポエチン(EPO)、トロンボポエチン等の造血因子、インターフェロン、IL-1やIL-6等のサイトカイン、モノクローナル抗体、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)、ウロキナーゼ、血清アルブミン、血液凝固第VII因子、レプチン、インシュリン、幹細胞成長因子(SCF)などを含むが、これらに限定されない。

- 5 タンパク質の中でも、EPO、G-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン等の造血因子が好ましく、さらに好ましくはEPO、G-CSFである。

- 本発明の製剤に使用されるタンパク質とは、哺乳動物、特にヒトの生理活性タンパク質と実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法により得られたものを含むが、好ましいのは遺伝子組換え法
10 により得られたものである。遺伝子組換え法によって得られるタンパク質には天然タンパク質とアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1又は複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。さらには、タンパク質はPEG等により化学修飾されたものも含む。

- 本発明において有効成分として使用するタンパク質としては、例えば糖鎖を有
15 するタンパク質が挙げられる。糖鎖の由来としては、特に制限はないが、哺乳動物細胞に付加される糖鎖が好ましい。哺乳動物細胞には、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、BHK細胞、COS細胞、ヒト由来の細胞等があるが、この中でも、CHO細胞が最も好ましい。

- 例えば、本発明のタンパク質製剤に使用するタンパク質がG-CSFである場
20 合には、G-CSFは高純度に精製されたG-CSFであれば全て使用できる。本発明におけるG-CSFは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、C127細胞、COS細胞などの動物由来の培養
25 細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。好ましくは大腸菌、イースト菌又はCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。さらには、PEG等により化学修飾されたG-CSFも含む(国際特許出願公開番号WO90/12874参照)。

また、本発明のタンパク質製剤に使用するタンパク質がEPOである場合には、EPOはいかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト尿より種々の方法で抽出し、分離精製したもの、遺伝子工学的手法（例えば特開昭61-12288号）によりチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、BHK細胞、COS細胞、

5 ヒト由来の細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。さらには、PEG等により化学修飾されたEPOも含む（国際特許出願公開番号WO90/12874参照）。さらに、糖鎖のついていないEPOをPEG等により化学修飾したものも含む。また、EPOのアミノ酸配列中のN-結合炭水化物鎖結合部位もしくはO-結合炭水化物鎖結合部位において、1以上の

10 グリコシル化部位の数を増加させるように改変したEPO類似体も含む（例えば、特開平8-151398号、特表平8-506023号参照）。さらには、糖鎖結合部位の数は変化させずに、シアル酸等の含量を増加させることにより糖鎖の量を増加させたものであってもよい。

本発明のタンパク質製剤には好ましくは安定化剤としてヒト血清アルブミンや

15 精製ゼラチンなどのタンパク質を実質的に含まない。

本発明のタンパク質製剤は、例えば、タンパク質がG-CSFであるときには、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上、好ましくは95%以上である。また、本発明のタンパク質製剤

20 は、タンパク質がEPOであるときには、50℃-1週間の加速試験後又は60℃-1週間の加速試験におけるEPO残存率が85%以上である。従って、従来知られているタンパク質製剤に比べて極めて安定な製剤である。

本発明のタンパク質製剤のpHは、好ましくはpH4~8であり、さらに好ましくはpH6.0~7.5である。しかしながら、pHは含まれるタンパク質により異なり、これらに限定されるものではない。例えばG-CSFの場合には好ましくは

25 pH5~7であり、さらに好ましくはpH6.0~6.7であり、さらに好ましいのはpH6.5である。EPOの場合には好ましくはpH5~8であり、さらに好ましくはpH5.5~pH7.0である。

本発明のタンパク質製剤に中に含まれるタンパク質の量は、使用するタンパク

質、治療すべき疾患の種類、患者の重症度、患者の年齢等に応じて決定できる。一般的には、 $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、好ましくは $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、さらに好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、さらに好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上さらに好ましくは $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のタンパク質を含む。例えばEPOの場合には、一般には $100 \sim 500000 \text{ IU}/\text{ml}$ 、好ましくは $200 \sim 100000 \text{ IU}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは $750 \sim 72000 \text{ IU}/\text{ml}$ である、また、G-CSFの場合には一般には $1 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $10 \sim 800 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは $50 \sim 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。

本発明で用いるトリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩は、遊離のトリプトファン又はトリプトファン誘導体ならびにそれらのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の製剤に使用するトリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩はD-、L-またはDL-体であってよく、より好ましいのはL-体である。トリプトファン誘導体には、トリプトファンメチルエステルヒドロクロライド、トリプトファノール、メチルトリプトファン、ベンジロキシトリプトファン、プロモトリプトファン、フルオロトリプトファン、ヒドロキシトリプトファン、ヒドロキシトリプトファンエチルエステルヒドロクロライド、ヒドロキシトリプトファンハイドレート、メトキシトリプトファン、アセチルトリプトファン、アセチルトリプトファンエチルエステル、アセチルトリプトファンアミド、オレイルトリプトファンエチルエステル、トリプトファンブチルエステルヒドロクロライド、トリプトファンエチルエステルヒドロクロライド、トリプトファンメチルエステルヒドロクロライド、トリプトファンオクチルエステルヒドロクロライド、トリプトファンアミドヒドロクロライド、フルオロトリプトファン、トリプトファノールオキサレート、アザトリプトファンヒドレート、フルオレニルメトキシカルボニルトリプトファン、カルボベンジロキシトリプトファン、プトキシカルボニルトリプトファン、メトキシカルボニルトリプトファンメチルエステル、ソリプトファンナフチルアミド、カルボベンジロキシトリプトファン、カルボベンジロキシアラニルトリプトファン、カルボベンジロキシイソロイシルトリプトファン、カルボベンジロキシイソロイシルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシメチオニルトリプトファン、カルボ

- ベンジロキシメチオニルトリプトファンアミド、カルボベンジロキシノルロイシルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシノルバリルトリプトファン、カルボベンジロキシフェニルアラニルトリプトファンアミド、カルボベンジロキシトリプトファンアミド、カルボベンジロキシチロシルトリプトファンアミド、
- 5 ド、カルボベンジロキシグリシルトリプトファン、カルボベンジロキシグリシルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシグリシルトリプトファンアミド、カルボベンジロキシグリシルグリシルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシメチオニルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシノルバリルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシノルバリルト
- 10 リプトファンアミド、カルボベンジロキシフェニルアラニルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシサルコシルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシサルコシルトリプトファンアミド、カルボベンジロキシトリプトファンナフチルアミド、カルボベンジロキシトリプトフィルトリプトファンメチルエステル、クロロアセチルトリプトファン、ダンシルトリプトファンクロロ
- 15 ヘキシルアンモニウム、グリシルトリプトファン、ホモトリプトファンヒドロクロライド、アラニルトリプトファン、アセチルトリプトファンメチルエステル、カルボベンジロキシトリプトファンニトロフェニルエステル、フリラクリロリルトリプトファンアミド、カルバミルトリプトファン、クロロアセチルトリプトファン、ニトロフェニルスルフェニルトリプトファンジアンモニウム、アセチルト
- 20 リプトファンプロピルエステル等を含む。本発明ではアセチルトリプトファン及びアセチルトリプトファン誘導体が特に好ましい。アセチルトリプトファン誘導体にはアセチルトリプトファンメチルエステル、アセチルトリプトファンエチルエステル、アセチルトリプトファンプロピルエステル、アセチルトリプトファンアミド、クロロアセチルトリプトファン等がある。
- 25 本発明の製剤に添加するトリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩の添加量は、使用するタンパク質の種類、タンパク質の濃度、製剤形態（凍結乾燥製剤又は溶液製剤）及び使用する誘導体により異なる。凍結乾燥製剤の場合には、一般に最終投与量として、0.1～300mMであり、好ましくは1～200mM、さらに好ましくは1～100mMである。溶液製剤の場合には、一般

に最終投与量として、0.1～30mMであり、好ましくは0.5～20mM、さらに好ましくは0.5～10mMである。なお、凍結乾燥製剤の場合、0.1～30mM、好ましくは1～30mM、さらに好ましくは1～10mMとすると、安定で且つ再溶解性に優れたタンパク質製剤を提供することができる。

- 5 タンパク質とアセチルトリプトファンの重量比は、凍結乾燥製剤の場合には一般に、1：1～1：1000である。EPOの場合は、好ましくは1：1～1：500、さらに好ましくは1：2～1：300である。G-CSFの場合は、好ましくは1：1～1：500、さらに好ましくは1：10～1：300である。溶液製剤の場合には、一般に1：1～1：1000であるが、EPOの場合は、
- 10 好ましくは1：1～1：500、より好ましくは1：10～1：250、さらに好ましくは1：100～1：150、最も好ましくは1：120である。

- 本発明の製剤にはメチオニンを添加することが好ましい。メチオニンを添加することにより、G-CSFのメチオニン残基酸化体生成率を検出限界以下にすることが観察されている（特願平11-52314号）。本発明者らは、特定の理
- 15 論に拘束されるつもりはないが、G-CSFのメチオニン残基に代えて、添加されたメチオニンが酸化されることにより、G-CSFのメチオニン残基酸化体生成率を低くすると推測した。

- 本発明の製剤には等張化剤として、ポリエチレングリコール；デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラク
- 20 トース、キシロース、マンノース、マルトース、シュークロース、ラフィノースなどの糖類を用いることができる。マンニトールが特に好ましい。マンニトールの添加量は製剤中に0.1～10%、さらに好ましくは0.5～6%である。

- 本発明の製剤には界面活性剤をさらに含むことができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウ
- 25 レート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン

- ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、
 ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタ
 ントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリスステアレート等のポリオ
 キシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラ
 5 ステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシ
 エチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステア
 レート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコ
 ールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエ
 チレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシ
 10 エチレンポリオキシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリオ
 キシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセ
 チルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；
 ポリオキシエチエレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキル
 フェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマ
 15 シ油(ポリオキシエチレン水素ヒマシ油)等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；
 ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導
 体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリ
 オキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のH
 LB 6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、
 20 ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18の
 アルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウ
 ム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数
 が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスル
 ホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアル
 25 キルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセ
 ロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18
 の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げるができる。本発
 明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせる添加す
 ることができる。

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、特に好ましいのはポリソルベート 20、21、40、60、65、80、81、85 であり、最も好ましいのはポリソルベート 20 及び 80 である。

本発明のタンパク質製剤に添加する界面活性剤の添加量は、一般には 0.0001 ~ 10% (w/v) であり、好ましくは 0.001 ~ 5% であり、さらに好ましくは 0.005 ~ 3% である。本発明のタンパク質製剤には、所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、賦形剤、pH 調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数 1 ~ 7 のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシルエーテル、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてよい。

本発明のタンパク質製剤は溶液製剤、凍結乾燥製剤、噴霧乾燥製剤などを含む。最も好ましくは凍結乾燥製剤である。

本発明の製剤は、これらの成分をリン酸緩衝液（好ましくはリン酸一水素ナトリウム-リン酸二水素ナトリウム系）及び／又はクエン酸緩衝液（好ましくはクエン酸ナトリウムの緩衝液）などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製し、あるいはこのようにして調製された溶液製剤を定法により凍結乾燥、又は噴霧乾燥することによって製造できる。

本発明の安定化されたタンパク質製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤

(皮下注、静注、筋注など)、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

本発明のタンパク質製剤は、例えば通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス容器中に収納されており、使用時に純水（注射用滅菌水）に溶解して使用
5 できる。

本発明のタンパク質製剤は、タンパク質がG-C S Fであるときには、後述の実施例に示すように、50℃-1ヶ月間の加速試験又は60℃-2週間の加速試験を行った後にも、極めて良好なG-C S F残存率を示す。本発明のG-C S F製剤は50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、
10 好ましくは95%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上である。

また、本発明のタンパク質製剤は、タンパク質がE P Oであるときには、後述の実施例に示すように、アセチルトリプトファンの添加量が極めて少量であっても、50℃-1週間の加速試験又は60℃-1週間の加速試験を行った後にもア
15 セチルトリプトファン無添加群に比べて5%以上の極めて良好なE P O残存率を示した。本発明のE P O製剤は50℃-1週間の加速試験後又は60℃-1週間の加速試験におけるE P O残存率が85%以上である。

なお、以下に示す実施例で使用したG-C S F又はE P Oとアセチルトリプトファン添加量との重量比、並びにこれらを用いて行った加速試験後のタンパク質
20 残存率を表1として示す。ここに示す重量比、残存率は本発明の一例を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

表 1

タンパク質量	アセチルトリ プトファン量	重量比	60°C-1 週間	60°C-2 週間	50°C-1 ヶ月
凍結乾燥製剤の 場合 G-CSF 100 μ g/mL	60mM	1:150	-	99.9%	100.4%
EPO 8.3 μ g/mL (1500IU/mL)	4mM (1mg/mL)	1:120	88.9%	-	-
EPO 8.3 μ g/mL (1500IU/mL)	8mM (2mg/mL)	1:240	89.8%	-	-
EPO 267 μ g/mL (48000IU/mL)	4mM (1mg/mL)	1:4	95.7%		
溶液製剤の場合 EPO 8.3 μ g/mL (1500IU/mL)	4mM (1mg/mL)	1:120	85.2% (50°C-1 週間)		

本発明のタンパク質製剤がG-C-S-F製剤であるときは、感染症や癌の化学治療において、抗生物質、抗菌剤、抗癌剤などの薬剤を投与する際に同時投与する
5 と、患者の抵抗力、活性などといった免疫応答力に基づいた防御機能を改善することが判明しており、臨床上極めて有用である。従って、本発明の製剤はこれらの薬剤と併用投与することができる。

本発明の製剤では、後述する実施例の結果から、トリプトファン又はトリプトファン誘導体を添加することにより特に常温における長期保存後のG-C-S-F又
10 はEPO残存率を増加することができる。

産業上の利用可能性

本発明のタンパク質製剤は、長期保存後においてもタンパク質の残存率が極めて高い、安定な製剤である。

15

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

20 実施例

(1) G-CSF 製剤の試験方法及び測定方法

試験方法

- G-CSF を含む各調剤液を調製し、無菌濾過を行った後、無菌的に各バイアルに 1 mL ずつ正確に充填し、凍結乾燥に供した。凍結乾燥終了後、完全打栓し、G-CSF 凍結乾燥製剤を製造した。尚、使用した G-CSF は組換え G-CSF であり、
- 5 添加したアミノ酸はいずれも遊離型で L- 体である。

このように無菌的に調製した G-CSF 含有凍結乾燥製剤を、60℃ の恒温槽内に 2 週間或いは 50℃ の恒温槽内に 1 ヶ月間静置した。

- 加速品製剤、及び未加速品製剤は、1 mL の純水で溶解し、下記の方法の試験
- 10 試料とした。

測定方法

- 試料は、C4 逆相カラム (4.6mm x 250mm, 300 オングストローム) を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法により G-CSF 含量を測定した。G-CSF として 5 µg 相当量を注入
- 15 し、アセトニトリルのグラジエントにより G-CSF を溶出させ、215 nm の波長で分光学的に検出した。

本方法で測定した G-CSF 含量を用い、下記の式に基づき、60℃ 2 週間、及び 50℃ 1 ヶ月間加速後の残存率 (%) を算出した。

- 20 (所定期間の加速後の G-CSF 含量)

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{加速後の G-CSF 含量}}{\text{(未加速品の G-CSF 含量)}} \times 100$$

- 25 (2) EP0 製剤の試験方法及び測定方法

試験方法

EP0 を含む各調剤液を調製し、無菌濾過を行った後、無菌的に各バイアルに 0.5 mL ずつ正確に充填し、溶液製剤を調製した。また、このようにして調製された溶液製剤から凍結乾燥製剤を調製した。凍結乾燥終了後、完全打栓し、EP0 凍

結乾燥製剤を製造した。尚、使用した EP0 は CHO 細胞から得た組換え EP0 であり、添加したアセチルトリプトファンは遊離型で L- 体である。

このように無菌的に調製した EP0 含有製剤を、50℃の恒温槽内に1週間或いは60℃の恒温槽内に1週間静置した。

5 測定方法

試料は、VyDAC 214TP54 カラムを用い、水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸の2液混合グラジエントを移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法により EP0 含量を測定した。214 nmの波長で分光学的に検出した。

10 実施例 1：種々のアミノ酸の G-CSF 残存率に及ぼす効果

以下の処方：

G-CSF 100 μ g/mL

アミノ酸 60 mM

マンニトール 2.5%

15 ポリソルベート 20 0.01%

の G-CSF 凍結乾燥製剤を調製し、60℃の恒温槽内に2週間或いは50℃の恒温槽内に1ヶ月間静置した後、上述した試験方法で残存率(%)を測定した。得られた結果を表2に示す。

表2

20

添加アミノ酸	60℃-2週間	50℃-1ヶ月
グリシン	82.3	86.4
アラニン	79.1	87.2
バリン	82.7	89.5
ロイシン	74.8	81.7
イソロイシン	78.7	79.4
セリン	81.6	88.0
トレオニン	81.3	87.7
アルギニン	77.2	93.7
メチオニン	72.7	78.0
アスパラギン酸	82.8	87.4
グルタミン酸	75.1	86.7

アスパラギン	84.2	87.5
グルタミン	83.0	86.9
リジン	77.7	90.4
フェニルアラニン	82.4	89.4
トリプトファン	94.0	94.0
ヒスチジン	81.5	93.1
プロリン	58.2	81.3

60℃の恒温槽内に2週間静置したときにも、50℃の恒温槽内に1ヶ月間静置したときにも、トリプトファンを添加した製剤が優れた残存率を示した。

5 実施例2：アセチルトリプトファンの添加量の G-CSF 残存率に及ぼす効果

G-CSF を100 μ g/mL、メチオニンを6mM、マンニトールを5%、ポリソルベート20を0.01%含み、アセチルトリプトファンの添加量を変化させた試料1-4を測定した結果を以下の表3に示す。なお、アセチルトリプトファンはNaOH溶液に溶解して使用した。

10 表3

	試料9	試料10	試料11	試料12
G-CSF	100 μ g/mL	100 μ g/mL	100 μ g/mL	100 μ g/mL
アセチルトリプトファン	0	30mM	60mM	90mM
50℃-1ヶ月	78.2%	99.2%	100.4%	100.1%
60℃-2週間	72.1%	95.0%	99.9%	100.1%

アセチルトリプトファン30mM、60mM、90mMいずれの添加量においても顕著な残存率を示した。

15

実施例3：アセチルトリプトファン添加の EPO 残存率に及ぼす効果

EPO溶液製剤の調製

調剤溶液1ml中に以下の成分：

EPO 1500国際単位

20

(又は48000国際単位)

マンニトール 50mg

ポリソルベート 80 0.05 mg
 アセチルトリプトファン 4 mM
 (又は 8 mM)

を含み、10 mM リン酸緩衝溶液にて pH 7.0 に調整した。

5 さらに、上記溶液製剤から凍結乾燥製剤を調製した。

(1) 溶液製剤における残存率

溶液製剤を 50℃ - 1 週間静置した後の EP0 残存率を表 4 に示す。

表 4

	試料 1 3	試料 1 4
EP0 [μ g/mL]	8.3	8.3
アセチルトリプトファン [mM]	0	4
50℃-1週間保存後の残存率 (%)	79.0	85.2

10

(2) 凍結乾燥製剤における残存率

凍結乾燥製剤を 60℃ - 1 週間静置した後の EP0 残存率を表 5 に示す。

表 5

	試料 1 3	試料 1 4	試料 1 5	試料 1 6	試料 1 7
EP0 [μ g/mL]	8.3	8.3	8.3	267	267
アセチルトリプトファン [mM]	0	4	8	0	4
60℃-1週間保存後の残存率 (%)	79.7	88.9	89.8	88.4	95.7

15

なお、試料 1 4, 1 5, 1 7 は非常に良好な再溶解性を示した。

請求の範囲

1. 安定化剤としてトリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩を含む安定したタンパク質製剤。
- 5 2. 安定化剤がアセチルトリプトファン又はアセチルトリプトファン誘導体、又はその塩である請求項1記載のタンパク質製剤。
3. 安定化剤がアセチルトリプトファン又はその塩である請求項2記載のタンパク質製剤。
4. タンパク質が糖鎖を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載
- 10 のタンパク質製剤。
5. タンパク質が遺伝子組換え法により産生されたことを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載のタンパク質製剤。
6. タンパク質がCHO細胞で産生されたことを特徴とする請求項5記載のタンパク質製剤。
- 15 7. タンパク質が造血因子であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のタンパク質製剤。
8. タンパク質がエリスロポエチンであることを特徴とする請求項7記載のタンパク質製剤。
9. タンパク質がG-CSFであることを特徴とする請求項7記載のタンパク質
- 20 製剤。
10. 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない請求項1～9のいずれかに記載のタンパク質製剤。
11. 凍結乾燥製剤である請求項1～10のいずれかに記載のタンパク質製剤。
12. 溶液製剤である請求項1～10のいずれかに記載のタンパク質製剤。
- 25 13. マンニトールをさらに含む請求項1～12のいずれかに記載のタンパク質製剤。
14. 界面活性剤をさらに含む請求項1～13のいずれかに記載のタンパク質製剤。
15. 界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである請求

項 1 4 記載のタンパク質製剤。

1 6. 界面活性剤がポリソルベート 2 0 及び／又は 8 0 である請求項 1 5 記載のタンパク質製剤。

1 7. pH が 4 ～ 8 である請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載のタンパク質製剤。

5 1 8. pH が 6. 0 ～ 7. 5 である請求項 1 7 記載のタンパク質製剤。

1 9. メチオニンをさらに含む請求項 1 ～ 1 8 のいずれかに記載のタンパク質製剤。

2 0. トリプトファン又はトリプトファン誘導体、又はその塩の添加量が 1 ～ 1 0 0 mM である、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載のタンパク質製剤。

10 2 1. 5 0 ℃－1 ヶ月間の加速試験後におけるタンパク質残存率が 9 0 % 以上であるか、6 0 ℃－2 週間の加速試験後におけるタンパク質残存率が 9 0 % 以上である、請求項 9 記載のタンパク質製剤。

2 2. 5 0 ℃－1 週間の加速試験後又は 6 0 ℃－1 週間の加速試験後におけるタンパク質残存率が 8 5 % 以上である、請求項 8 記載のタンパク質製剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/32, 38/22, 9/19, 9/08, 47/18, 47/10, 47/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/32, 38/22, 9/19, 9/08, 47/18, 47/10, 47/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 63-146829, A (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 18 June, 1988 (18.06.88), (Family: none)	1, 4-7, 9-12, 17-22 2, 3, 13-16
Y		
X	EP, 909564, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 21 April, 1999 (21.04.99), & JP, 10-182481, A & WO, 97/40850, A1 & US, 6120761, A	1, 4-8, 10-12, 14-22 2, 3, 13
Y		
Y	JP, 10-265404, A (Mitsui Chem. Inc.), 06 October, 1998 (06.10.98), (Family: none)	2, 3
Y		
Y	JP, 56-154419, A (The Green Cross Corporation), 30 November, 1981 (30.11.81), (Family: none)	2, 3, 13
Y		
Y	EP, 428758, A1 (The Green Cross Corporation), 29 May, 1991 (29.05.91), & JP, 03-017023, A & WO, 90/15617, A1 & DE, 69031974, E & KR, 186824, B	2, 3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23 May, 2001 (23.05.01)Date of mailing of the international search report
05 June, 2001 (05.06.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01524

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB, 2193631, A (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 17 December, 1988 (17.12.88), & JP, 63-146826, A & JP, 63-146827, A & DE, 3723781, A & FR, 2601591, A & NL, 192917, A & SE, 8702907, A & DK, 8703683, A & AU, 8775665, A & ZA, 8705268, A & IL, 83220, A & NO, 171828, A & CN, 87104963, A & KR, 9304597, B	13-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/32, 38/22, 9/19, 9/08, 47/18, 47/10, 47/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/32, 38/22, 9/19, 9/08, 47/18, 47/10, 47/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 63-146829, A (中外製薬株式会社) 18. 6月. 1988 (18. 06. 88) (ファミリーなし)	1, 4-7, 9-12, 17-22
Y		2, 3, 13-16
X	EP, 909564, A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 21. 4月. 1999 (21. 04. 99)	1, 4-8, 10-12, 14-22
Y	&JP, 10-182481, A &WO, 97/40850, A1 &US, 6120761, A	2, 3, 13
Y	JP, 10-265404, A (三井化学株式会社) 6. 10月. 1998 (06. 10. 98) (ファミリーなし)	2, 3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 05. 01

国際調査報告の発送日

05.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳子 印

4P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 56-154419, A (株式会社ミドリ十字) 30. 11月. 1981 (30. 11. 81) (ファミリーなし)	2, 3, 13
Y	EP, 428758, A1 (THE GREEN CROSS CORPORATION) 29. 5月. 1991 (29. 05. 91) &JP, 03-017023, A &WO, 90/15617, A1 &DE, 69031974, E &KR, 186824, B	2, 3
Y	GB, 2193631, A (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 17. 2月. 1988 (17. 02. 88) &JP, 63-146826, A &JP, 63-146827, A &DE, 3723781, A &FR, 2601591, A &NL, 192917, B &SE, 8702907, A &DK, 8703683, A &AU, 8775665, A &ZA, 8705268, A &IL, 83220, A &NO, 171828, A &CN, 87104963, A &KR, 9304597, B	13-16